（別紙様式２）

平成 23 年度　調査研究実績報告書

１　課題名　　種子伝染性病害の検査手法に関する調査

２　小課題名　　エンドウモザイク病に関する調査

３　調査研究実施期間：平成 19 年度 ～ 21, 23 年度　（　新　・　継　・（完））

４　課題実施責任者及び担当者の所属並びに氏名

病害検査室　牛尾裕、佐藤仁敏

５　調査研究の目的

エンドウモザイク病はエンドウ種子伝染モザイクウイルス（PSbMV）によって起こる種子伝染性病害であり、種苗会社から検査の導入を期待されている。本調査では、ISTA 法に準拠した本ウイルスの種子-ELISA 法を検討し、種子検査法の実証を行った。

６　調査研究の方法

種苗会社から分譲を受けた PSbMV 自然感染種子を用いて調査を行った。

（１）安定的に検出できる推定汚染率の調査

汚染率 12.6%の自然感染種子を３つに分け、ミルを用いて粉末に加工した。これらに健全種子の粉末を混合し、２倍の段階希釈系列（粉末）を作った。ELISA 検定は、各粉末ごとに２ g ずつ供試して２回行った。抗体は DSMZ 社製（AS-0129 Batch no: 4021）を用い、取扱説明書に準じて行った。３つの希釈系列を比較して安定的に検出出来る最も高い希釈率を調べ、汚染率を推定した。なお、基質投入から２時間後の吸光値を用いて判定を行った。

（２）100 粒中に汚染種子１粒が存在する場合の判定のばらつき

100 粒中に汚染種子１粒を混合した 19 個の集団を作製した。これらの集団を上記と同様の粉末に加工し、同様の ELISA 検定を行った。基質を投入した２時間後及び翌日に判定を行い、判定の結果を比較した。

（３）ISTA 検査法の実証

自然感染種子と健全種子を混合し、推定汚染率１%の種子集団を２つ作製した。ISTA 法に準拠して各集団を 100 粒ずつ 10 個のサブサンプルに分け、ELISA 検定を行った。ELISA 法は上記と同様に行った。各サブサンプルにおける反復間の判定を比較した。なお、基質投入から 2 時間後の吸光値を用いて判定を行った。

７　調査研究結果の概要・要約

（１）安定して検出可能な汚染率：表１に ELISA 検定の判定結果を示した。2 回の ELISA 判定に差はなかった。全ての希釈系列を通じて、2^5 倍希釈まで陽性であった。なお、2^5 倍希釈の試料は汚染率 0.4%と算出された。

（２）汚染種種子１粒が混在する場合の判定：表２に ELISA 検定の判定と判定数を示した。２時間後よりも一晩後の方が陽性判定が２集団多かった。

（３）ISTA 検査法の実証：表３に ELISA 検定の判定結果を示した。各集団においてそれぞれのサブサンプルの各反復間では ELISA 検定による判定は同一であった。どちらの集団も陽性であると確認されたため、推定汚染率 1%の種子集団を ISTA 検査法によって検出可能であることが確認された。

８　主要成果の具体的データ

表１．汚染種子粉末の希釈系列を供試した ELISA 検定

供試集団	種子粉末の希釈倍率							
	2^1	2^2	2^3	2^4	2^5	2^6	2^7	2^8
1	＋*1	＋	＋	＋	＋	－*2	－	－
2	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	－
3	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－

*1. 判定の基準は、陽性（＋）≧ 0.10 とした。*2. 判定の基準は、0.10 ＞陰性とした。

表２．100 粒中に汚染種子１粒が存在する 19 集団の ELISA 検定

集団の判定*1	基質投入からの時間と判定数		備　　考
	2 時間後	翌日	（ 反復間の判定）
陽性	13	15	＋と＋
擬陽性	2	2	±と±または－と±
陰性	4	2	－と－

*1. 判定の基準は、陽性（＋）≧ 0.10、擬陽性（±）≧ 0.05、0.05 ＞陰性とした。

表３．ISTA 検査法による推定汚染率 1%の種子ロットを供試した ELISA 検定

供試集団	反復	サブサンプル番号と判定数									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1	＋*1	＋	＋	－*2	－	－	＋	－	＋	＋
	2	＋	＋	＋	－	－	－	＋	－	＋	＋
2	1	＋	－	－	＋	＋	－	－	－	－	－
	2	＋	－	－	＋	＋	－	－	－	－	－

*1. 判定の基準は、陽性（＋）≧ 0.10 とした。*2. 判定の基準は、0.10 ＞陰性とした。

９　今後の問題

精度の高い種子検査を実施する。

１０　次年度の計画

なし。

１１　業務改善に活かし得る事項

本年度、依頼種子検査にエンドウモザイク病を追加する。

１２　成果の発表等

なし。

注　Ａ４版２枚で作成すること。